Principy vyšetření hemostázy

Trombóza - Hemostáza - Krvácení

Fyziologie krevního srážení

- Základní homeostatický mechanizmus
- Spolupůsobení různých systémů včetně regulačních zpětných vazeb
  - Cévní stěny
  - Trombocytů
  - Plazmatické koagulační faktory
  - Plazmatické inhibitory
  - Systém fibrinolytický

Dělení testů

- Testy globální
  - postihují celý systém (i více)
- Testy skupinové (screening)
  - postihují určitou část koagulačního systému
  - umožňují odlišení poruch vnitřní a vnější cesty a přeměny fibrinogenu
- Testy speciální
  - vyšetřují jednotlivé složky systémů

Dělení testů dle principu

- **Koagulační**
- **Fotometrické**
- **Imunochemické**

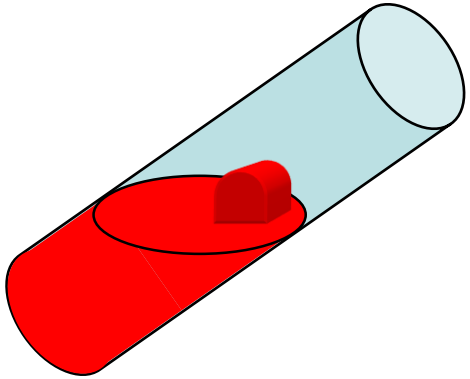
- Turbidimetrické (jiné než koagulační, imunochemické)
- Sledování času rozpuštění koagula
- Sledování rozpustnosti koagula
- Jiné

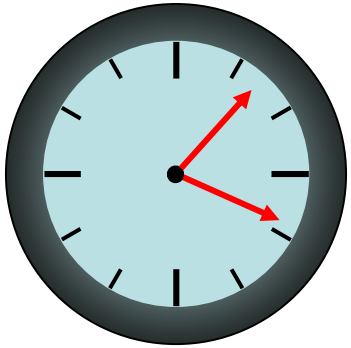
Dělení testů dle principu

- Koagulační
  - sledování času srážení (srážlivá plná krev)
    - bez přídavku aktivátoru/aktivovaná doba srážení (ACT)
      - manuálně (kývání)
      - POCT (přenosné přístroje point of care)
  - sledování času vytvoření fibrinového vlákna
    - manuálně (háčkování)
    - koagulometr (poloautomat, automat)
      - mechanické
        - » kuličkové (sledování změn pohybu kuličky)
        - » háčkové
        - » vibrační
      - optické
        - » nefelometrie (sledování rozptylu světla)
        - » turbidimetrie (sledování průchodnosti světla)
        - » limitace – chylózní vzorky

Kývání

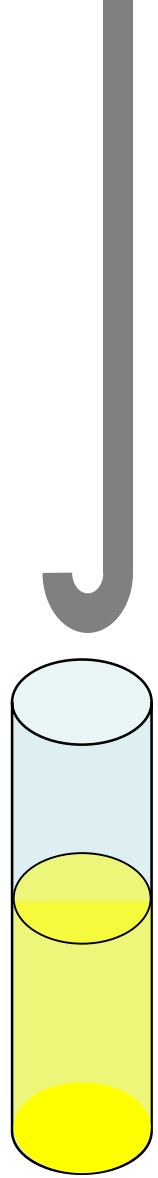
- Naklánění zkumavky
- První metoda detekce času srážení
  - Vizuálně pozorujeme vznik sraženiny
- Používáno například pro RČ
  - RČ – rekalcifikační čas (plasmy, plné krve)

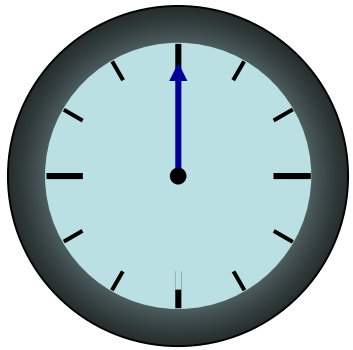


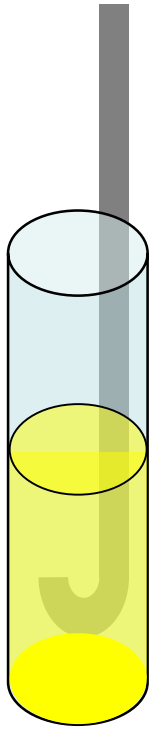


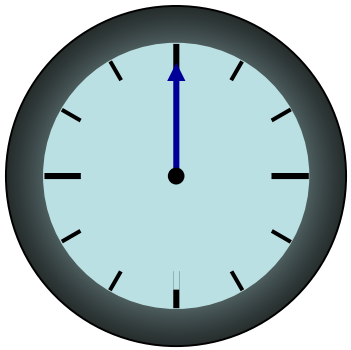
„Háčkování“

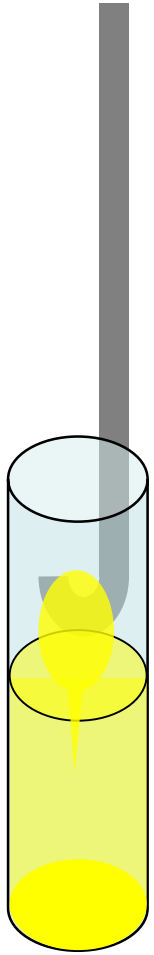
- První skutečně použitelná metoda
- Protahujeme háček reakční směsí a pozorujeme vznik koagula
- Dostatečně přesná, dostatečně citlivá









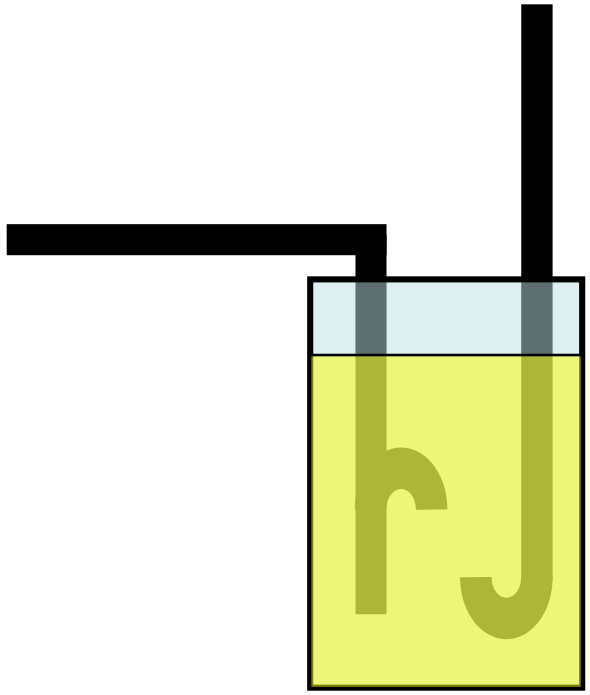


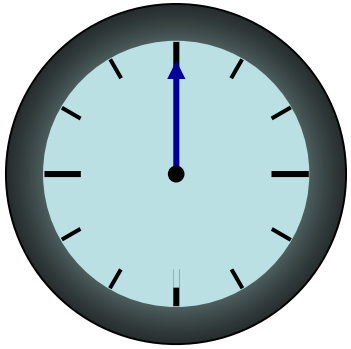
„Háčkování“

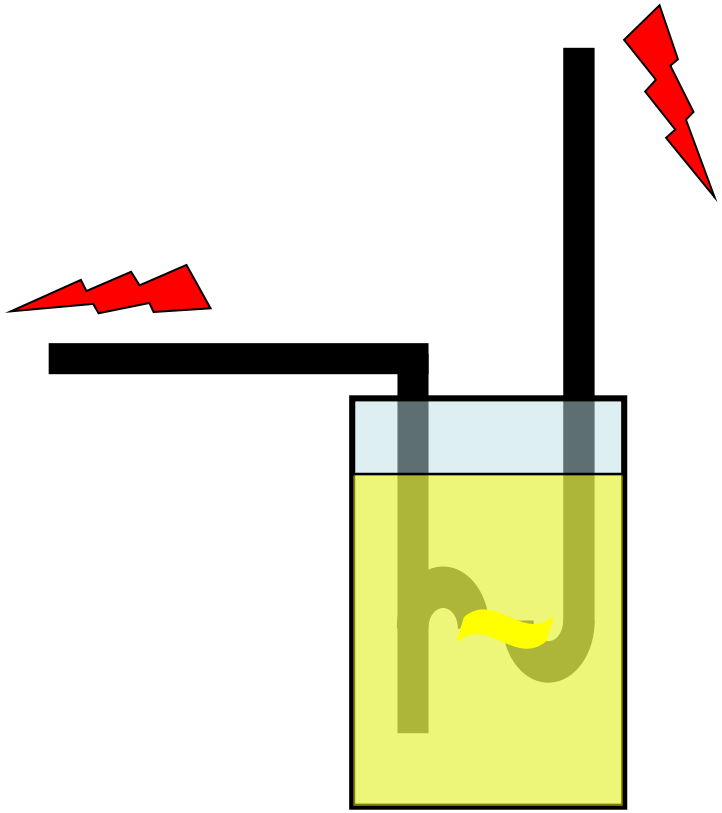
- Výhody
  - Jednoduché a levné vybavení
  - Velmi zkušená laborantka je přesná
- Nevýhody
  - Potřeba velmi zkušeného personálu
  - Subjektivní ovlivnění
  - Velký vliv koncentrace fibrinogenu
  - Velká spotřeba reagencií

Háčkové koagulomery

- Využívají vyšší vodivosti fibrinového vlákna
- Dvě elektrody, alespoň jedna ve tvaru háčku
- Vzniklé fibrinové vlákno vodivě spojí elektrody – zaznamená se čas







Háčkové koagulometry

- Výhody:
  - Relativně přesné
  - Málo citlivé na koncentraci fibrinogenu
  - Detekují opravdu první fibrinové vlákno
- Nevýhody:
  - Komplikovaná jemná mechanika
  - Pracné čištění
  - Velký objem reagencií

Koagulometry vibrační

- Princip
  - v kyvetě umístěn vibrující plátek s elektromagnetickou detekcí
  - Při tvorbě fibrinu dochází ke zvýšení viskozity a zpomalení vibrace kovového plátku
  - Vyhodnocení změny frekvence vibrací se současným zastavením ukazatele času
- Výhody
  - poměrně citlivý, není prakticky citlivý na koncentraci fibrinogenu
- Nevýhody
  - obtížná manipulace s vibr. plátky a možnost kontaminace vzorku

Koagulometry kuličkové

- Kuličkové
- Měří se změna viskozity
  - Viskozita reakční směsi ovlivňuje pohyb detektoru
- Detektor je kulička
- Po startu mají mrtvý čas
  - Nutné k nastavení přístroje pro příslušný vzorek

Viskozitní koagulometry

- Citlivost
  - Je nepřímo úměrná momentu hybnosti detektoru **p = m * v** (m=hmotnost,v=rychlost)
- Přesnost
  - Je přímo úměrná frekvenci pohybu detektoru
    - Frekvence pohybu je úměrná rychlosti
- Zvýšení citlivosti-snížení momentu hybnosti detektoru
  - Snížení hmotnosti
    - Má limity, příliš nízká hmotnost detektoru znamená větší možnost rušení
  - Snížit rychlost
    - Menší rychlost znamená menší přesnost

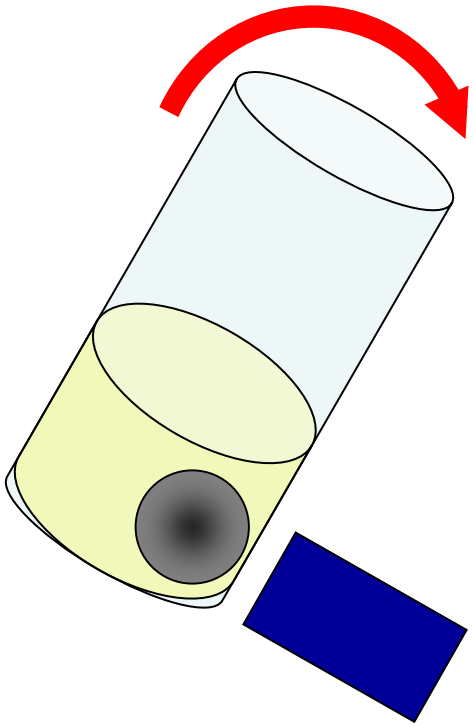
Kuličkové koagulometry

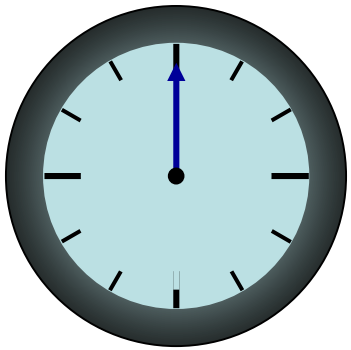
- Detektorem je kovová kulička
  - Většinou ocelová
  - Někdy se specifickým potahem na povrchu
- Riziko zmagnetizování kuliček
  - Nereprodukovatelné výsledky

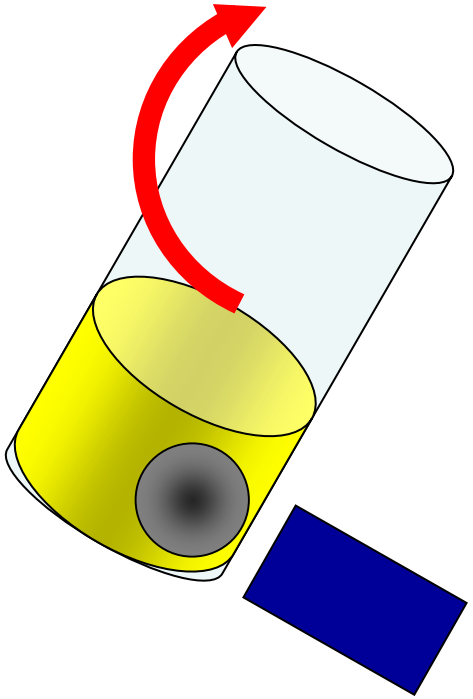
Koagulometry Amelung

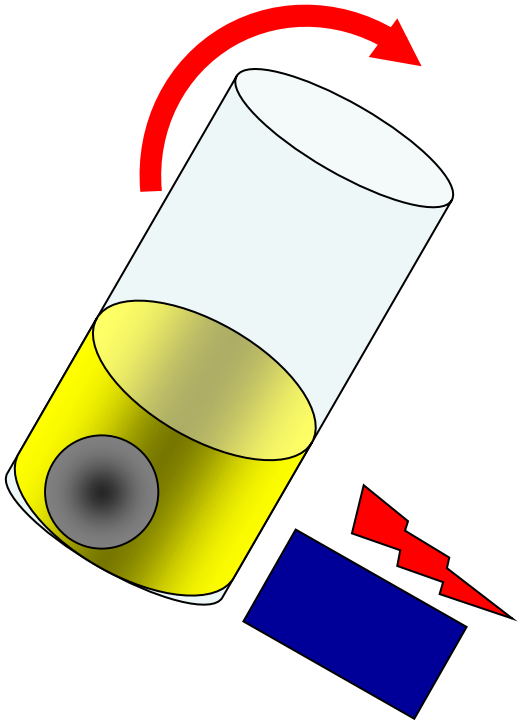
- Rotující kyveta s kuličkou
- Magnetický senzor
- Poměrně velká kulička
- Poměrně pomalý pohyb

- První masově rozšířený koagulometr







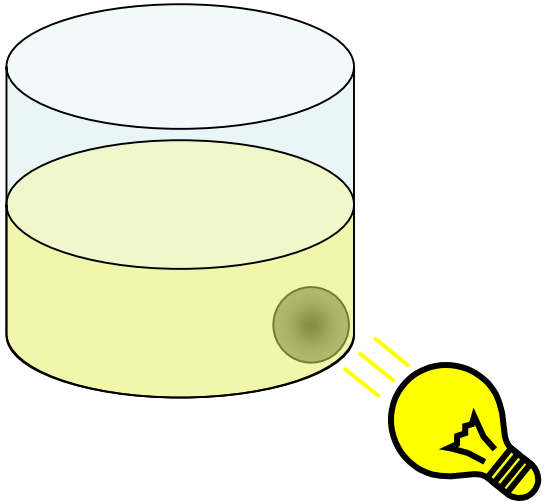


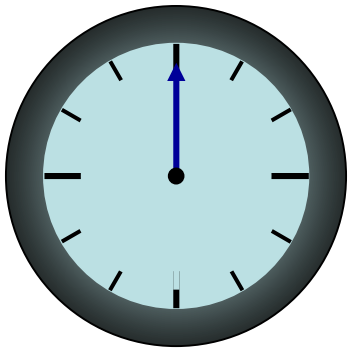
Koagulometry Amelung

- Výhody
  - Kulička prochází většinou objemu
- Nevýhody
  - Velký objem reagencí
  - Nižší citlivost

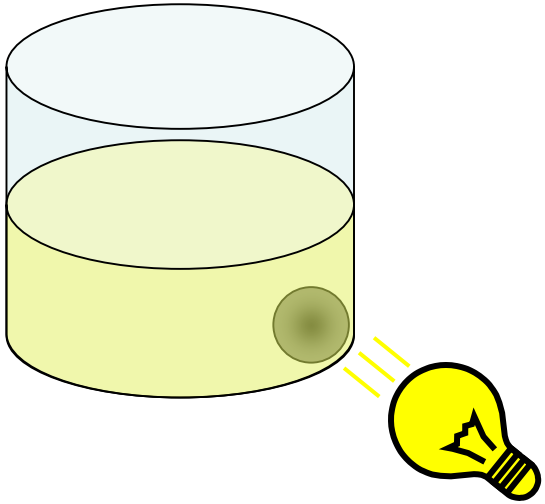
Koagulometry Benck CL

- Kuličkový koagulometr
- Malá kulička, rychlá rotace
- Optický senzor
- Měří změnu frekvence průchodů kuličky před detektorem

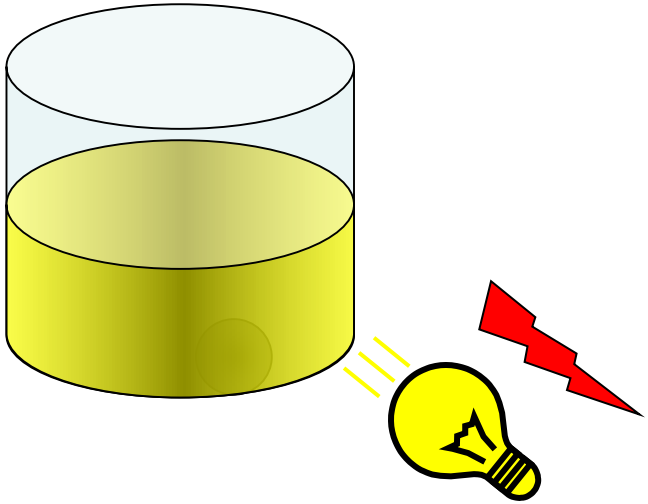


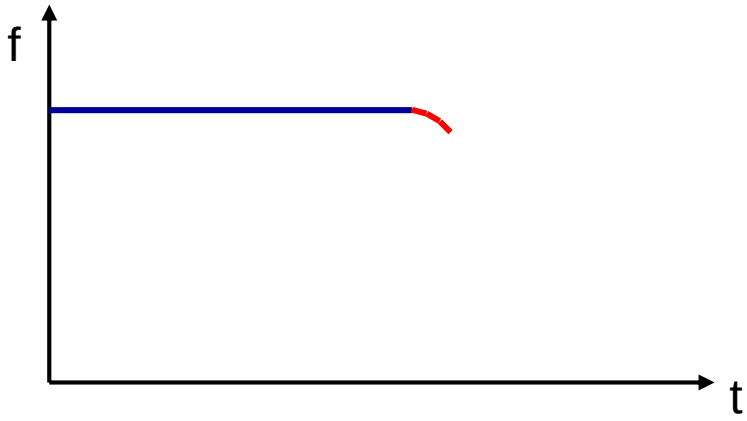


f
t



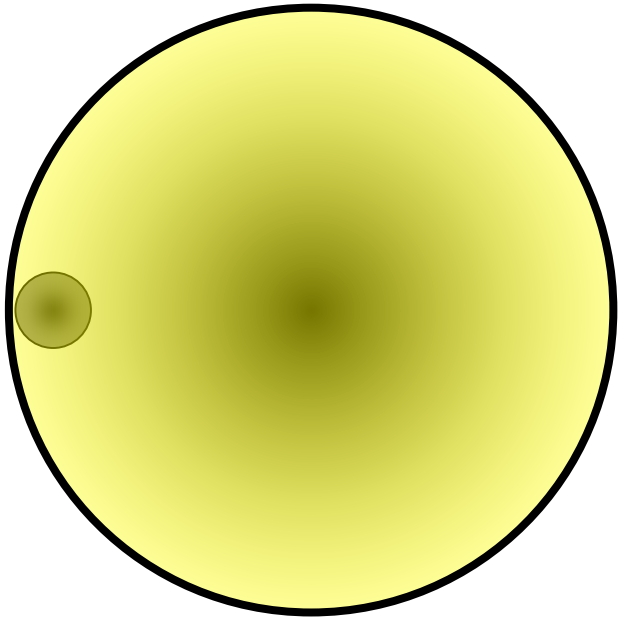
f
t

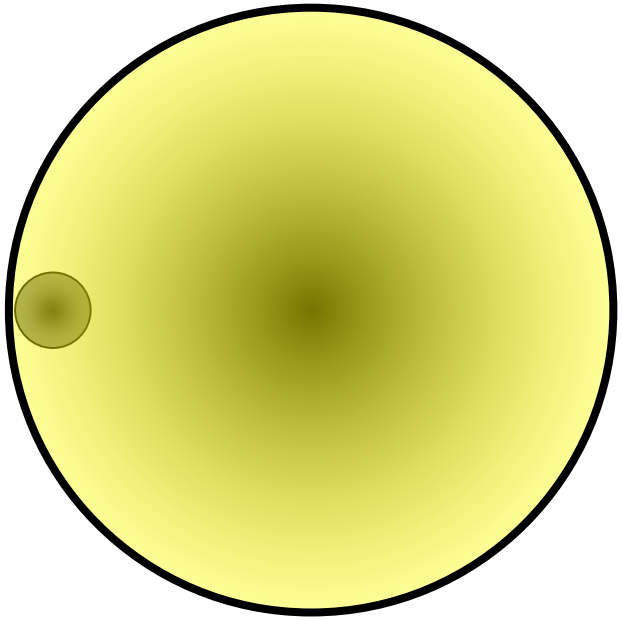



f
t

Koagulometry Benck CL

- Výhody
  - Malý objem reagencií
  - Průměrná citlivost
- Nevýhody
  - Problémy se vzorky s dlouhým nebo velmi krátkým koagulačním časem
    - Kulička tuneluje





Koagulometry Stago

- Kuličkový koagulometr
- Malá kulička, kývavý pohyb
- Elektromagnetický senzor
- Měří změnu frekvence a amplitudy kuličky
- Zpomalení, zastavení pohybu kuličky je detekováno jako koagulační čas

Koagulometry Stago

- Výhody
  - kývavý pohyb kuličky – mění se rychlost
    - v úvratích má kulička nulovou rychlost
    - velice vysoká citlivost
    - měření fibrinogenu od 0,2 g/l
  - chylózní, ikterické, hemolytické vzorky

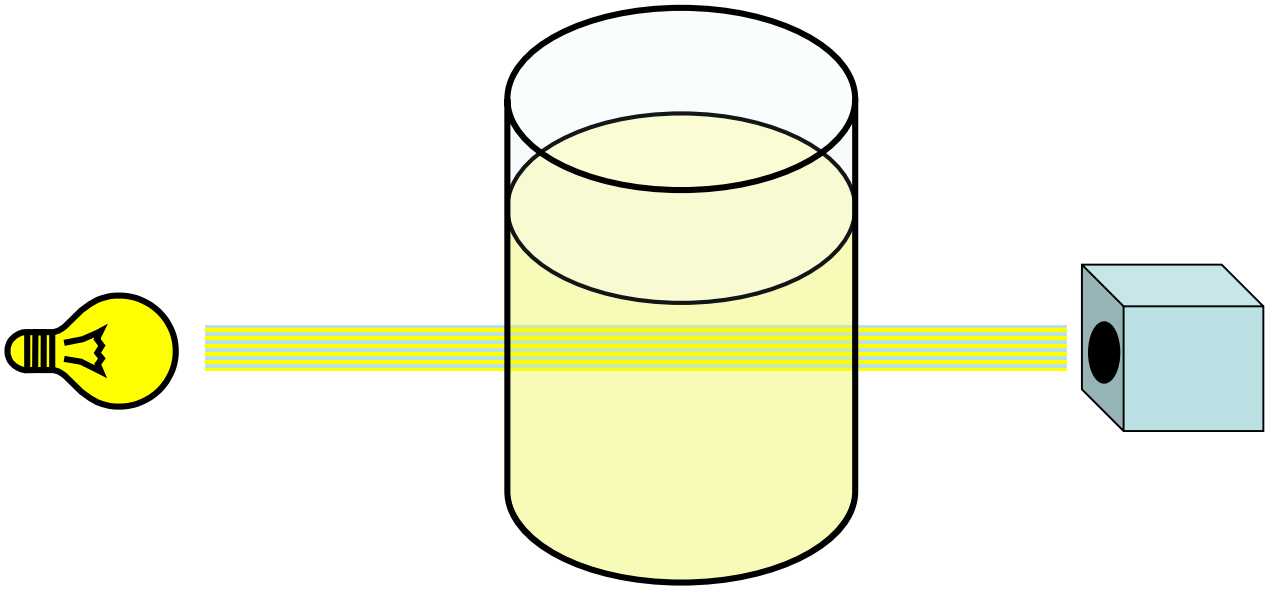
- Nevýhody
  - velký objem reagencií pro fotometrické testy z důvodu přítomnosti kuličky

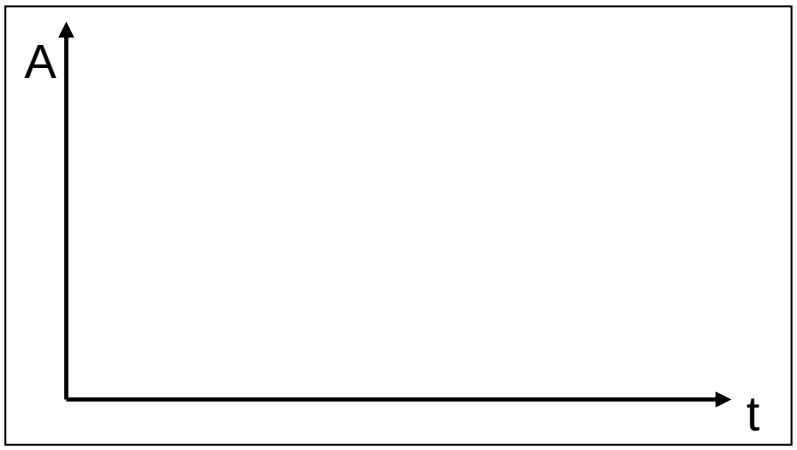
Optické koagulometry

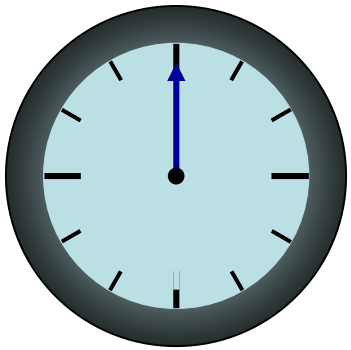
- Měří vznik zákalu nikoli přímo koagula
  - Problém vyhodnocení naměřené reakční křivky
  - Různí výrobci mají rozdílné řešení
    - Určení rozdílu před a po koagulaci (Siemens)
    - Derivace koagulační křivky (Organon)
    - Určení počáteční rychlosti (např. ACL)

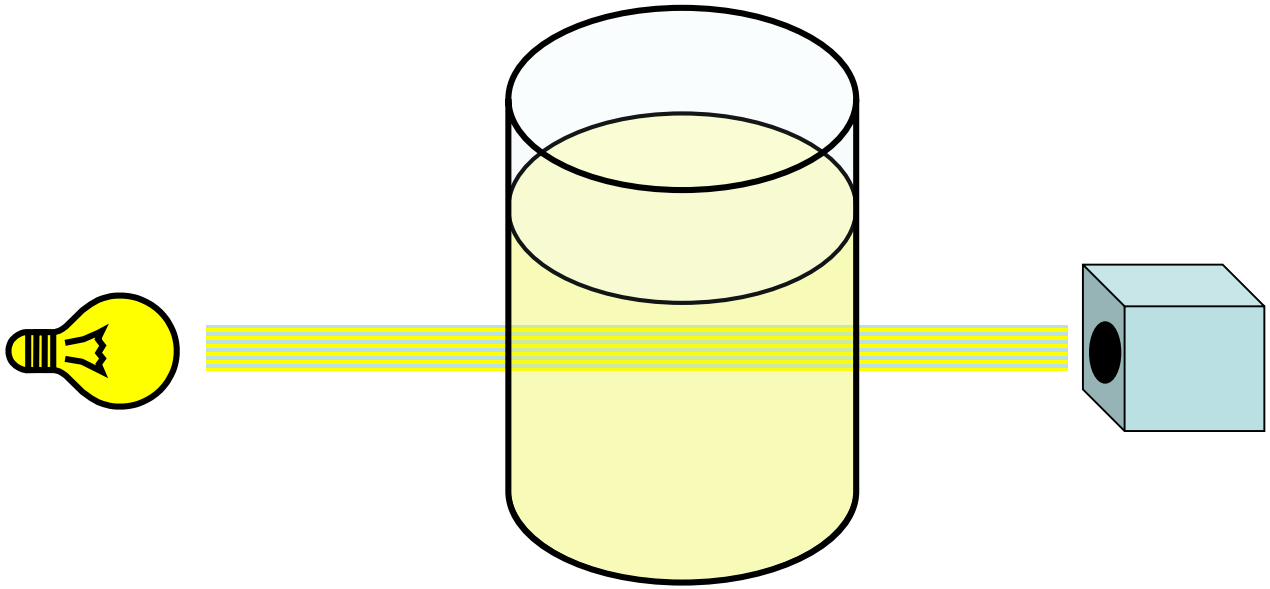
Optické koagulometry

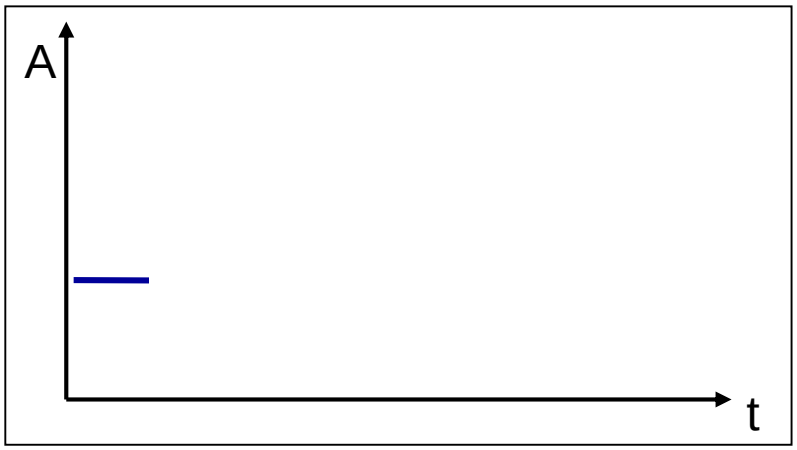
- Citlivé na rychlost tvorby koagula
  - nízký fibrinogen
  - přítomnost inhibitorů (heparin)
- Citlivé na zabarvení plasmy
  - iktterická plasma
  - chylózní plasma
  - hemolytická plasma

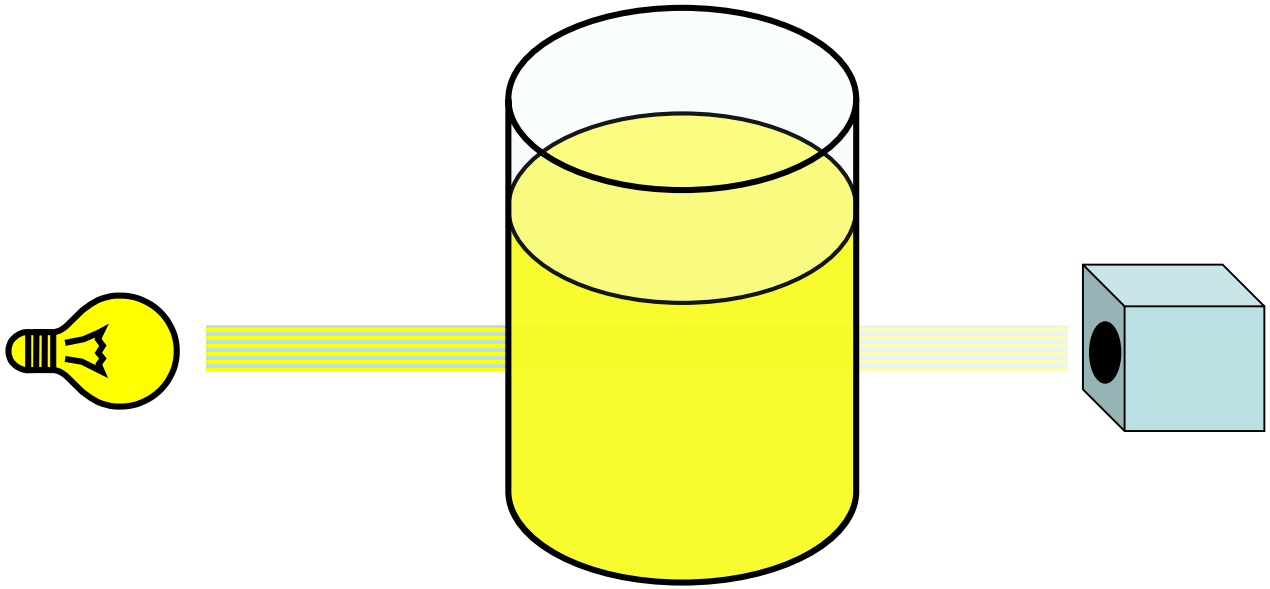


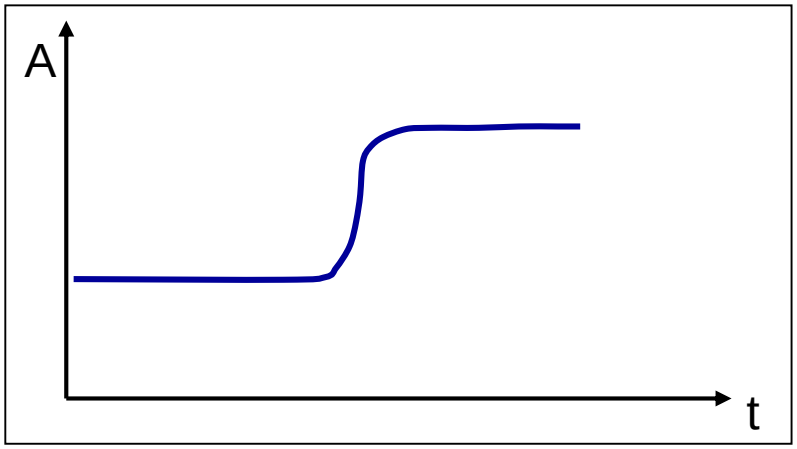

A
t



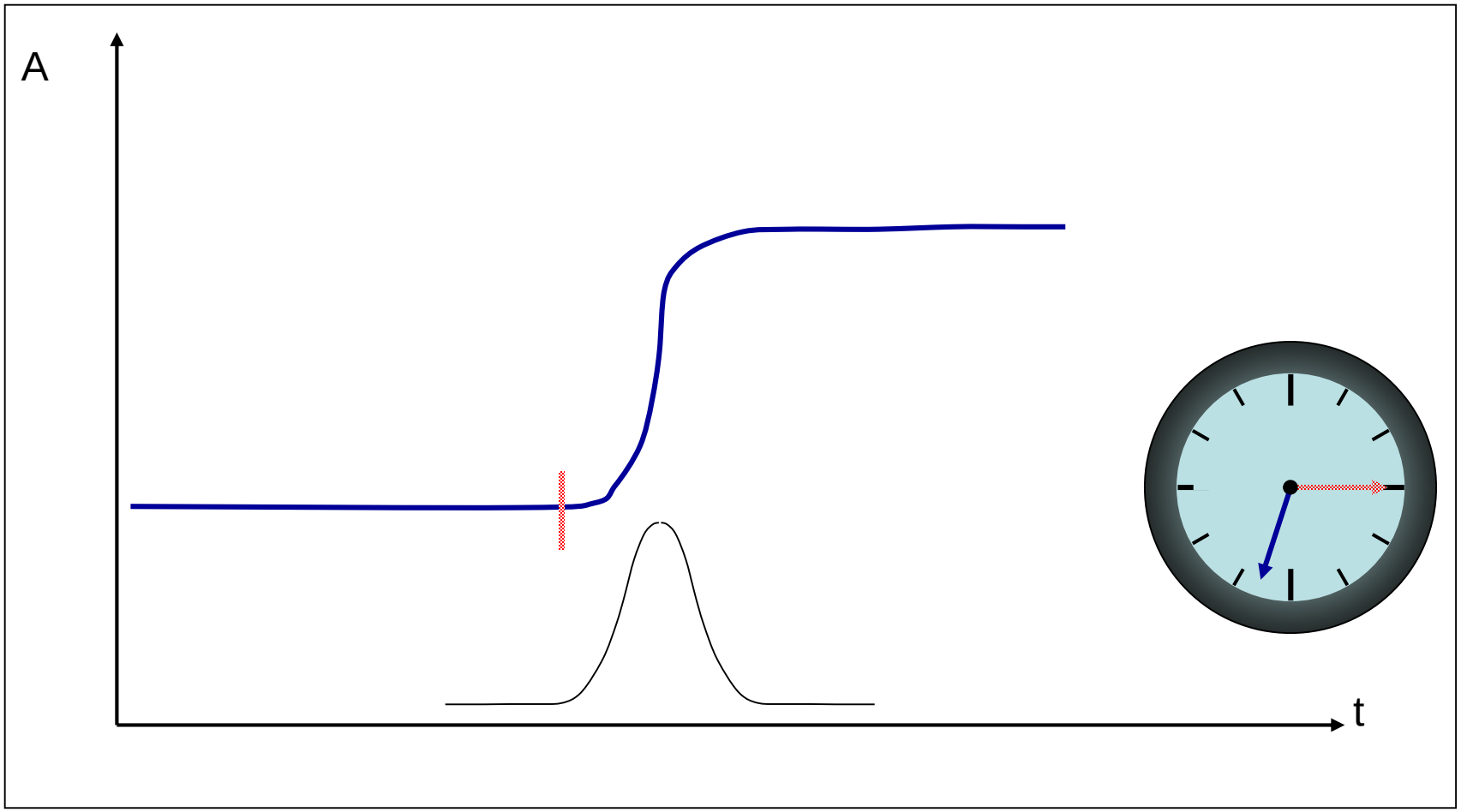



A
t

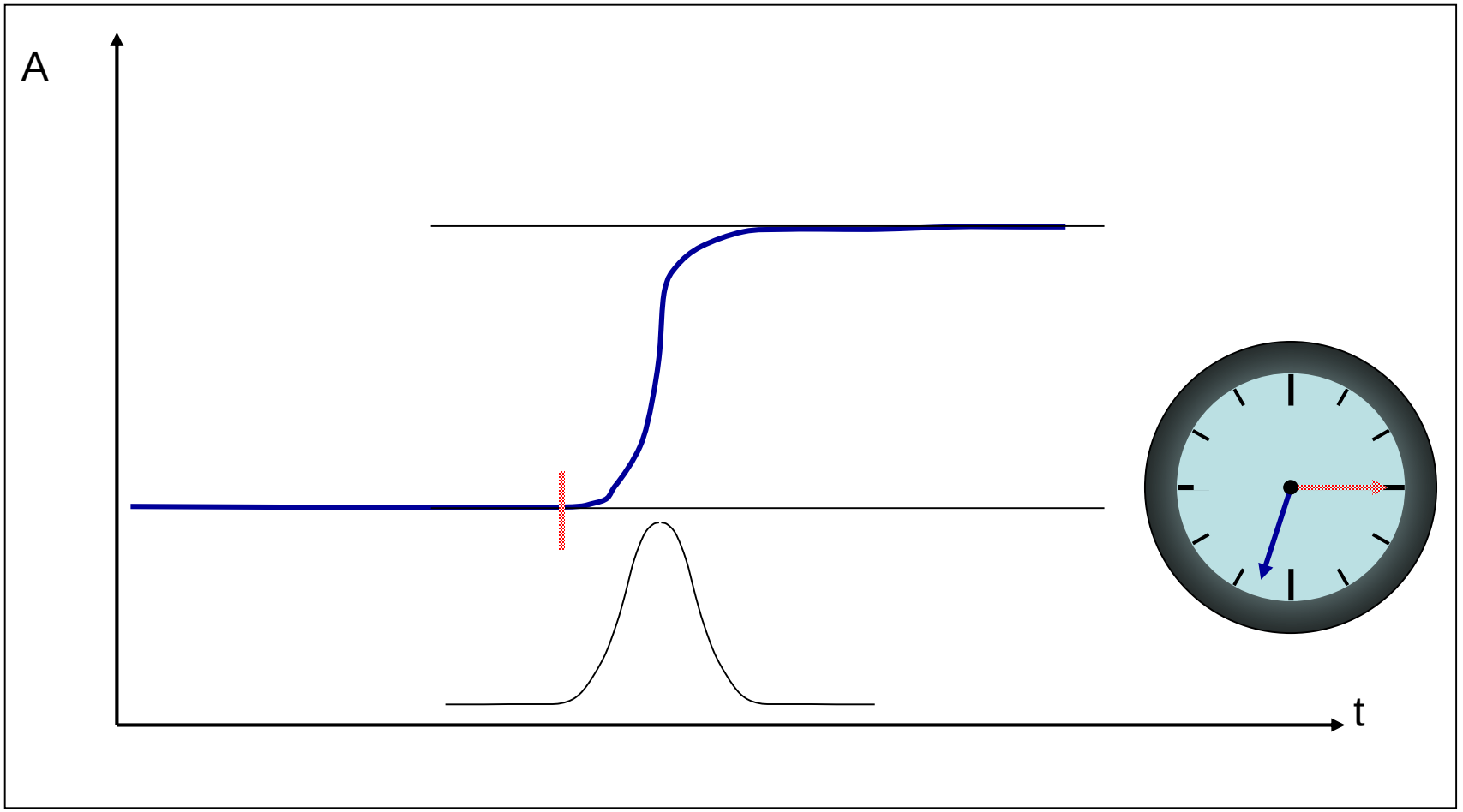



A
t

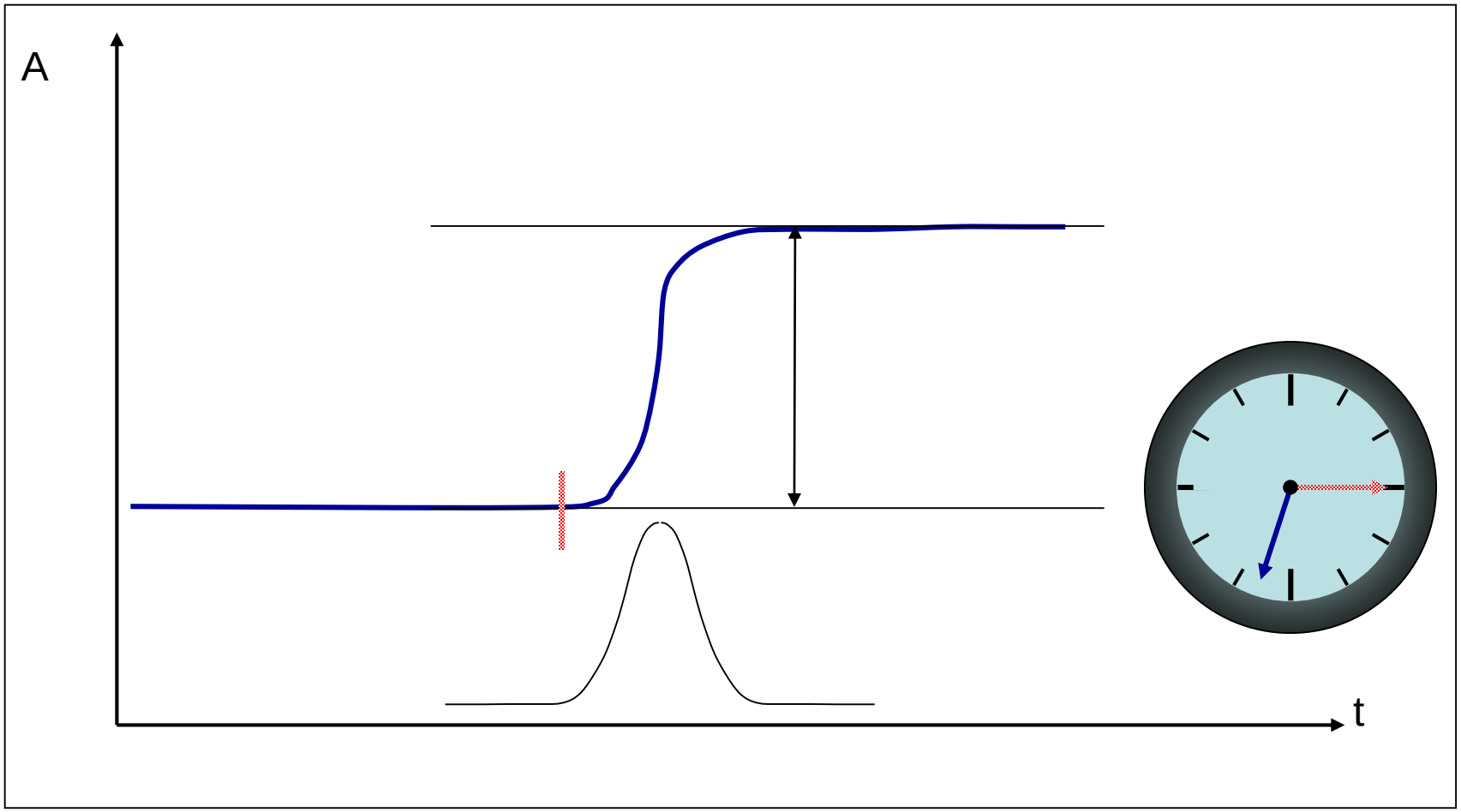
Derivace



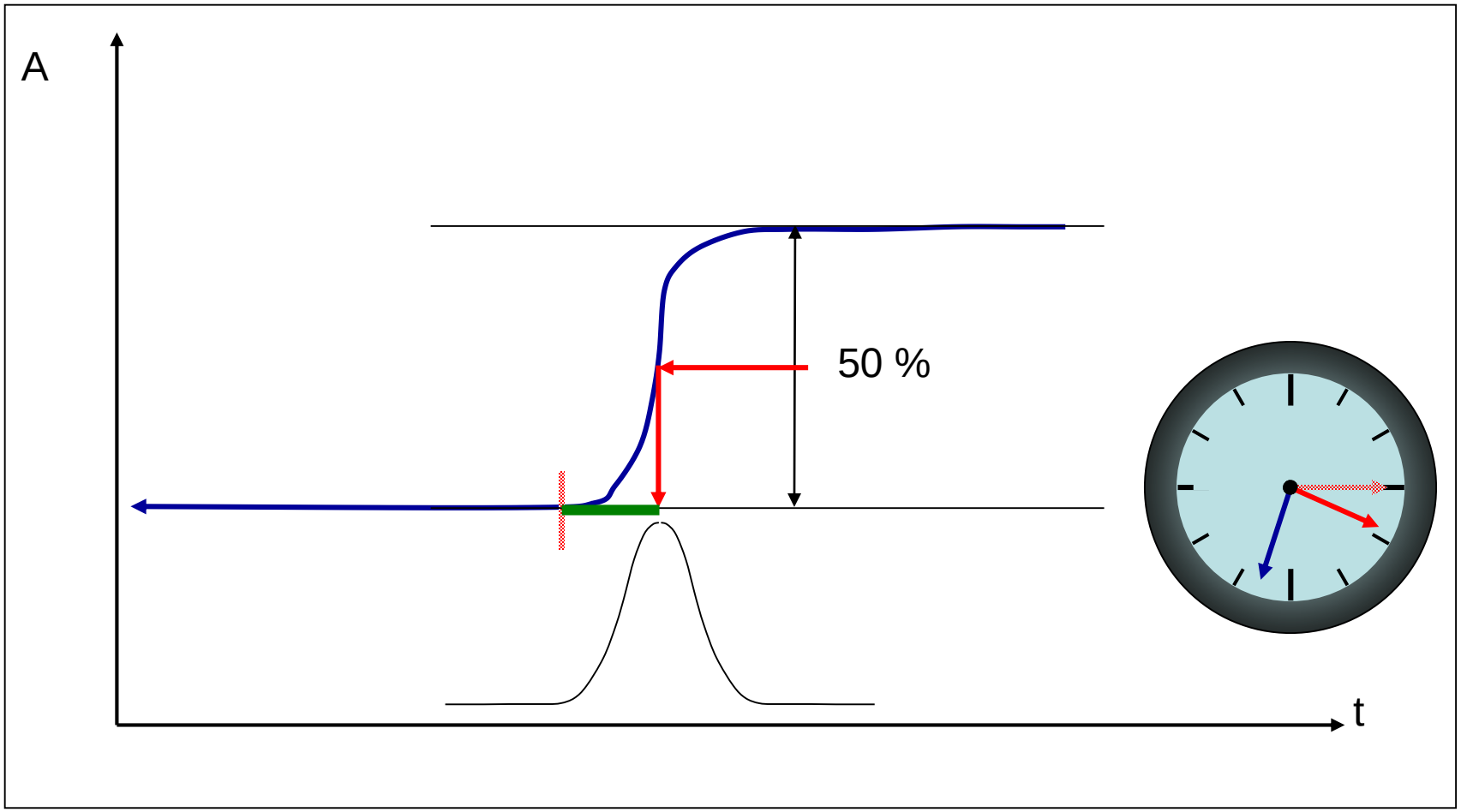
Rozdíl



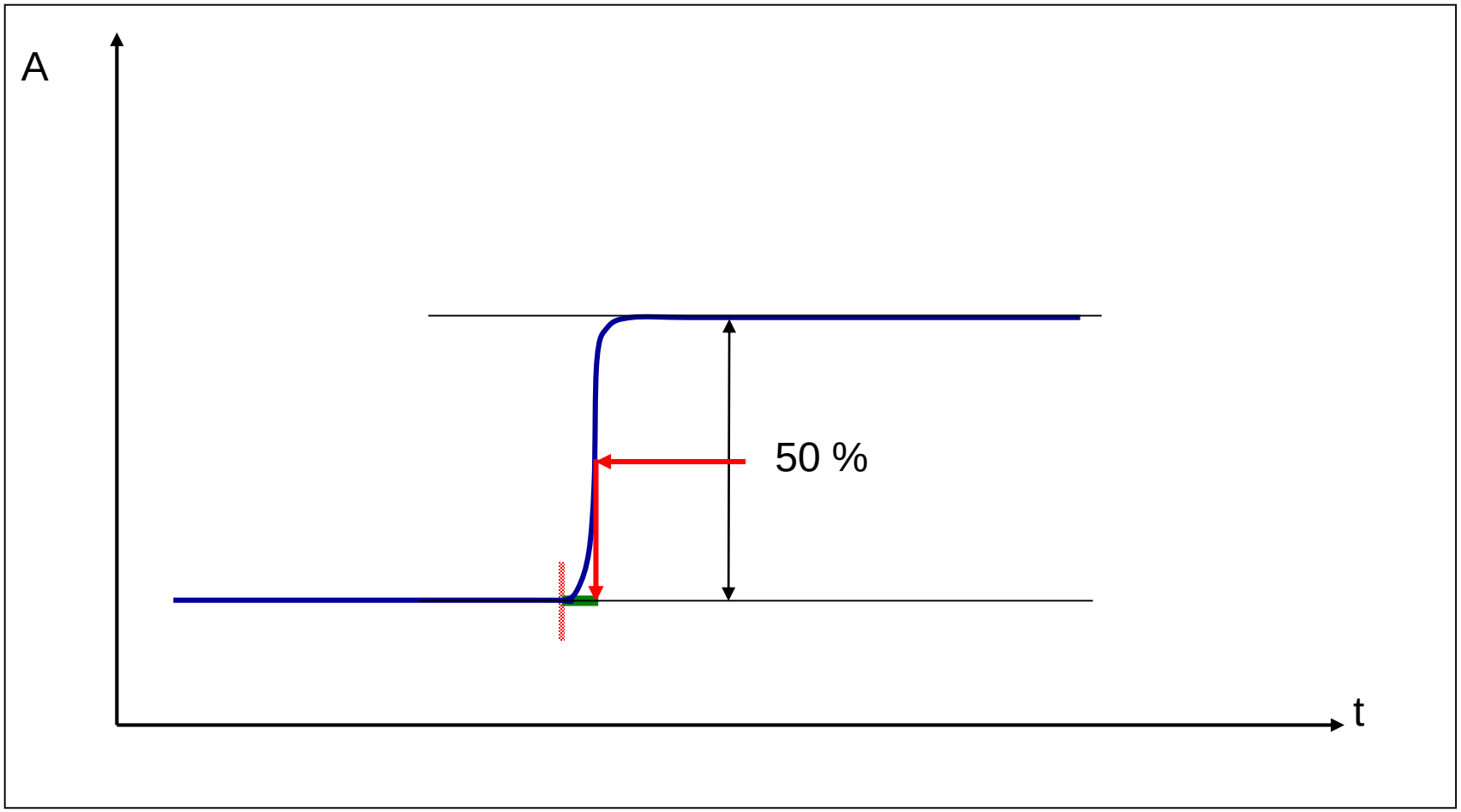
Rozdíl



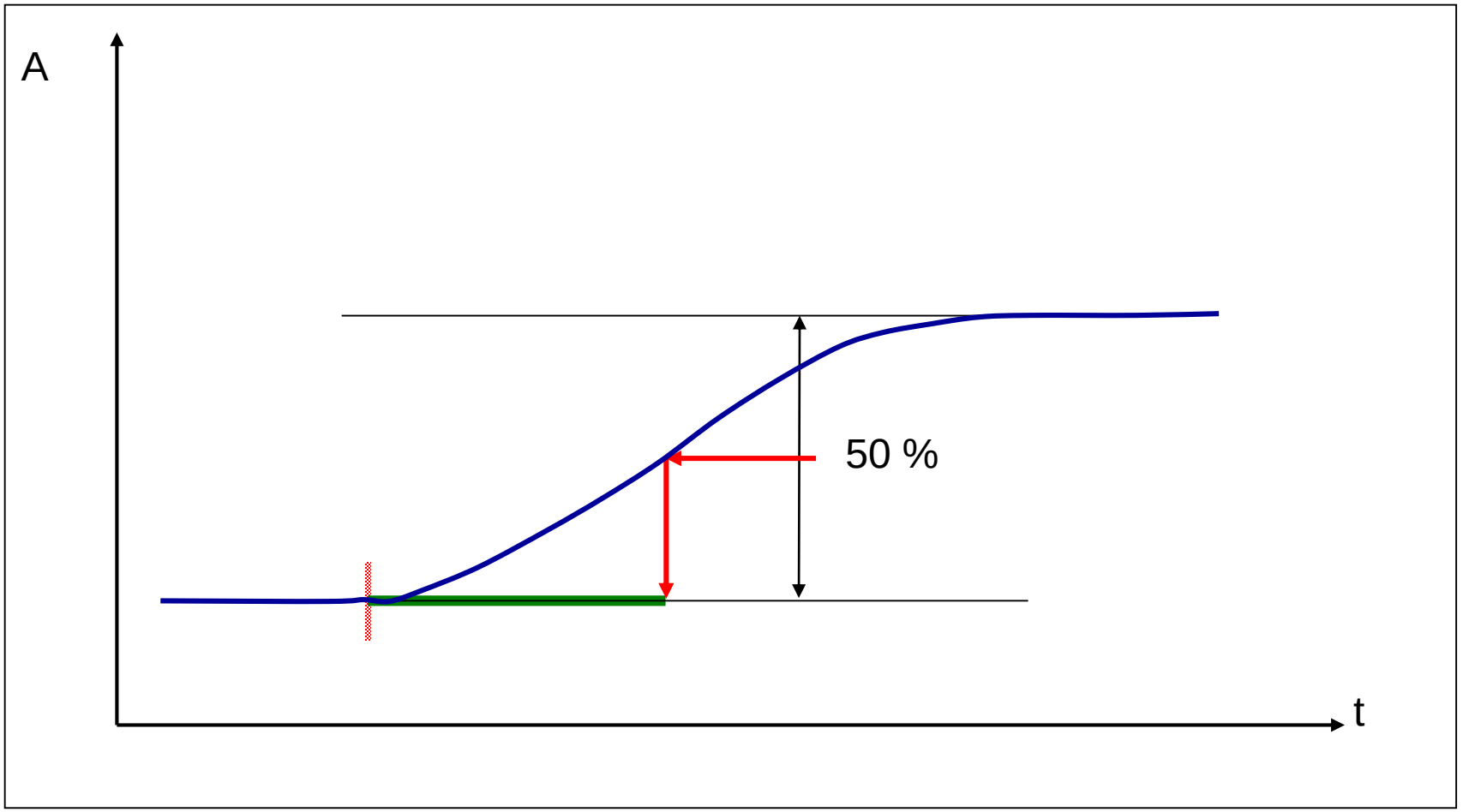
Rozdíl



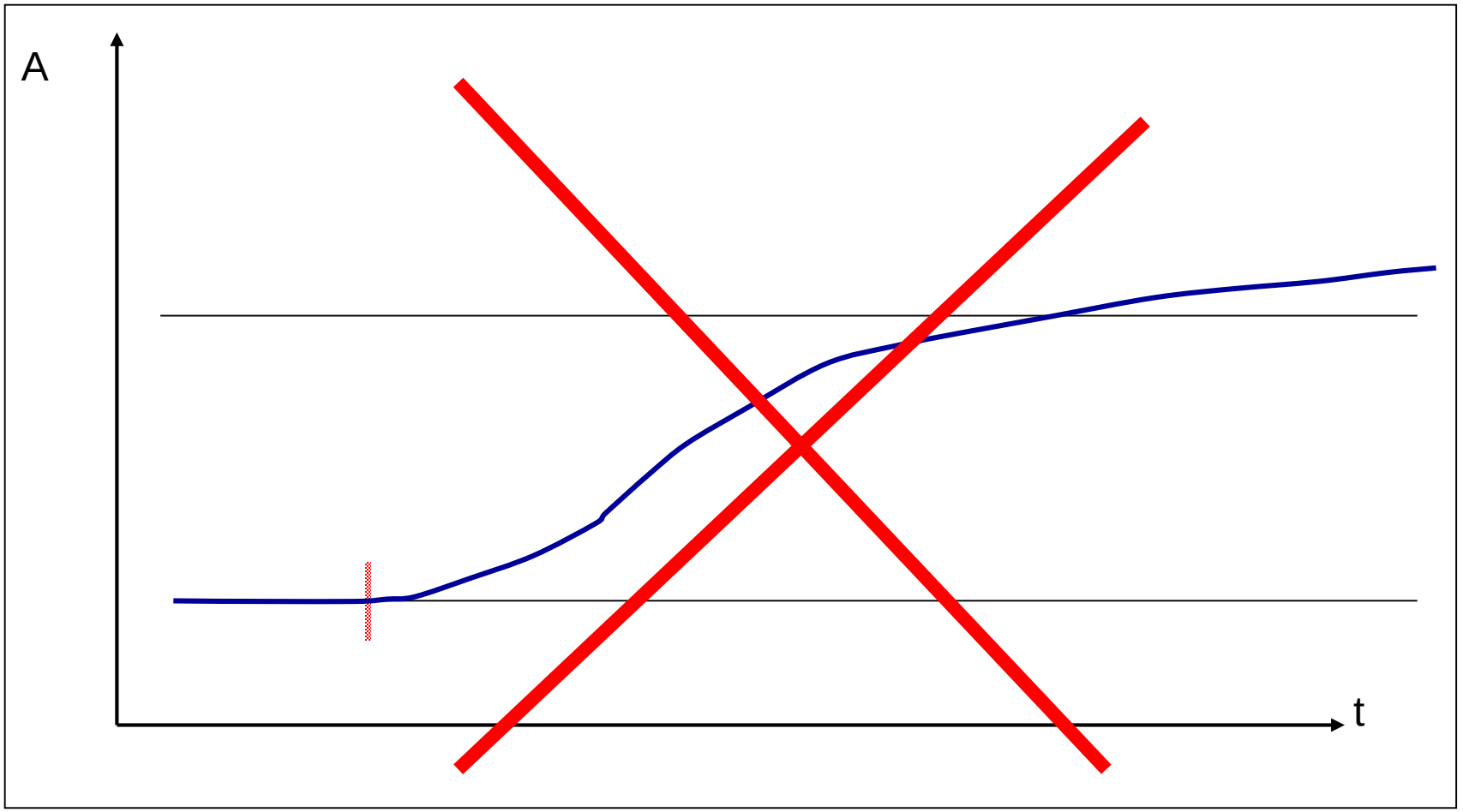
Rozdíl



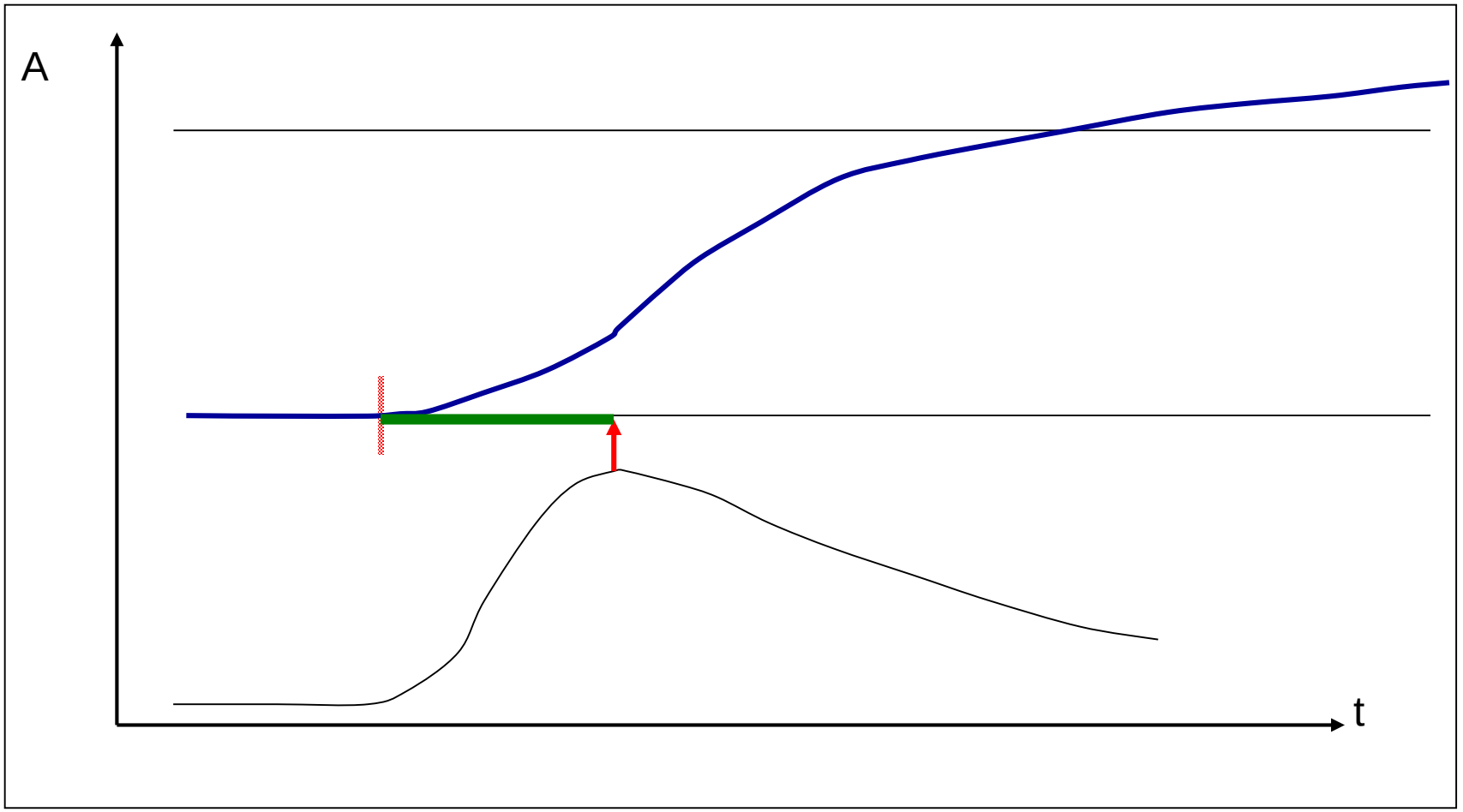
Rozdíl



Rozdíl



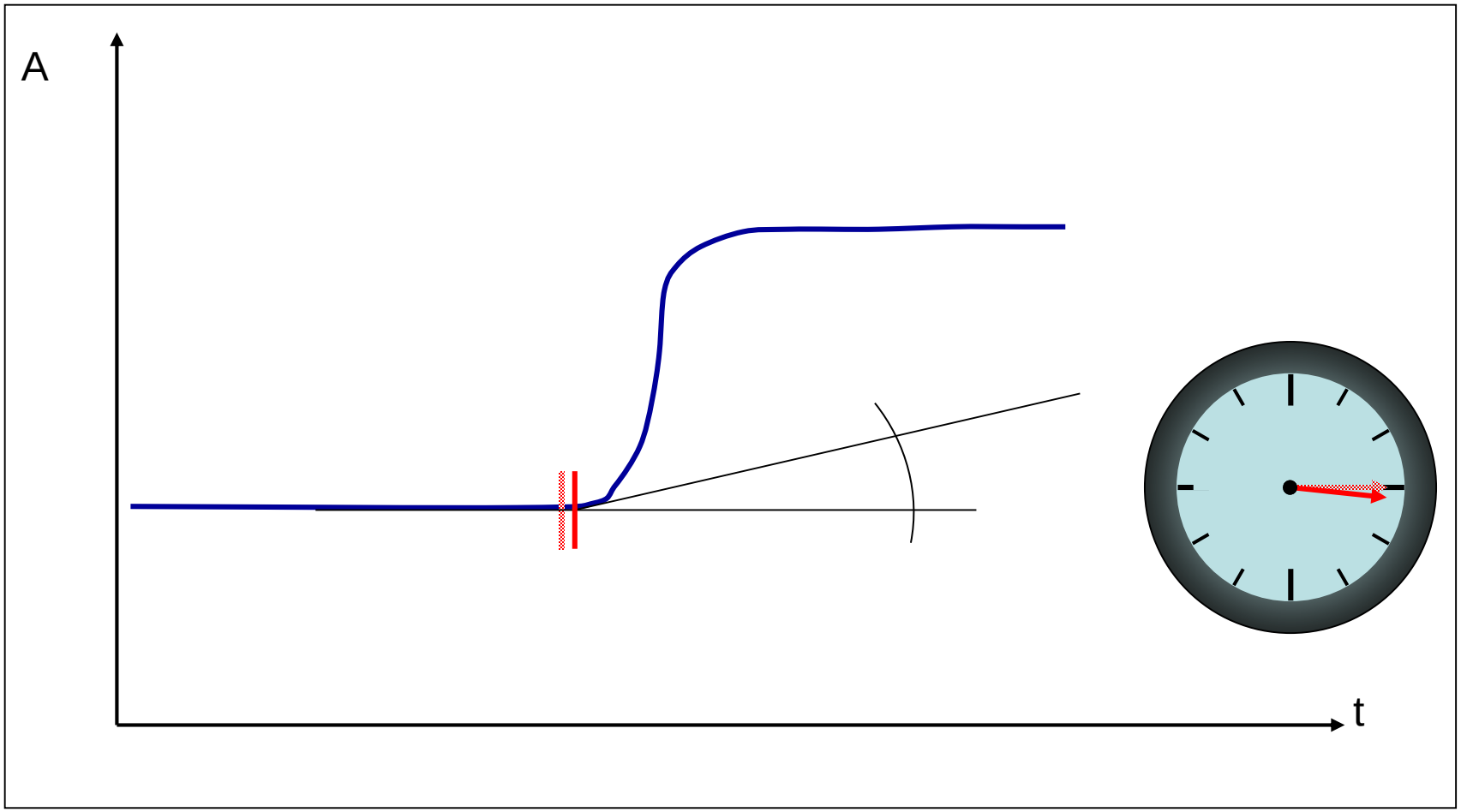
Derivace



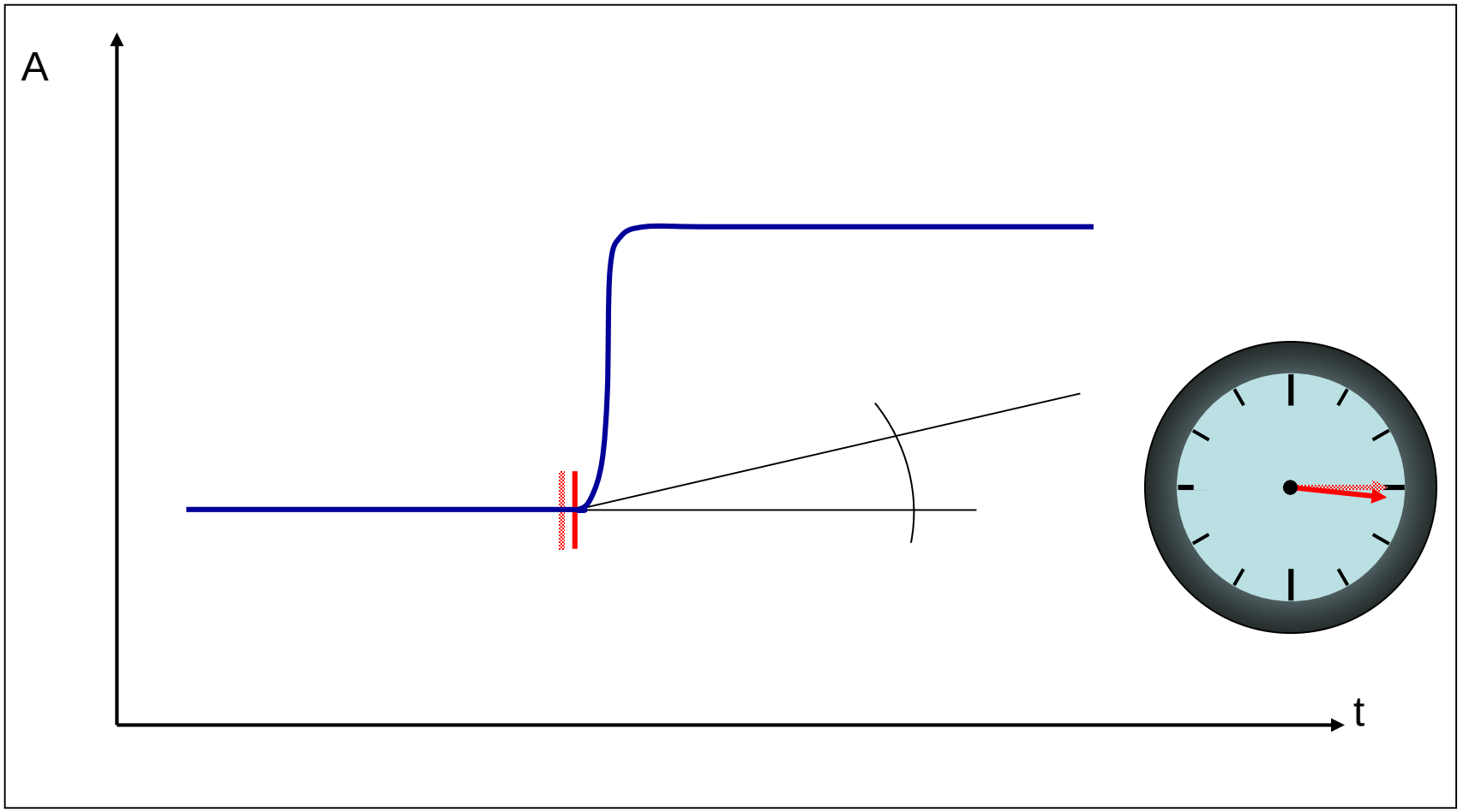
Rozdíl a Derivace

- Není problém u normálních vzorků
- U pomalu koagulujících vzorků významně prodlužují koagulační časy

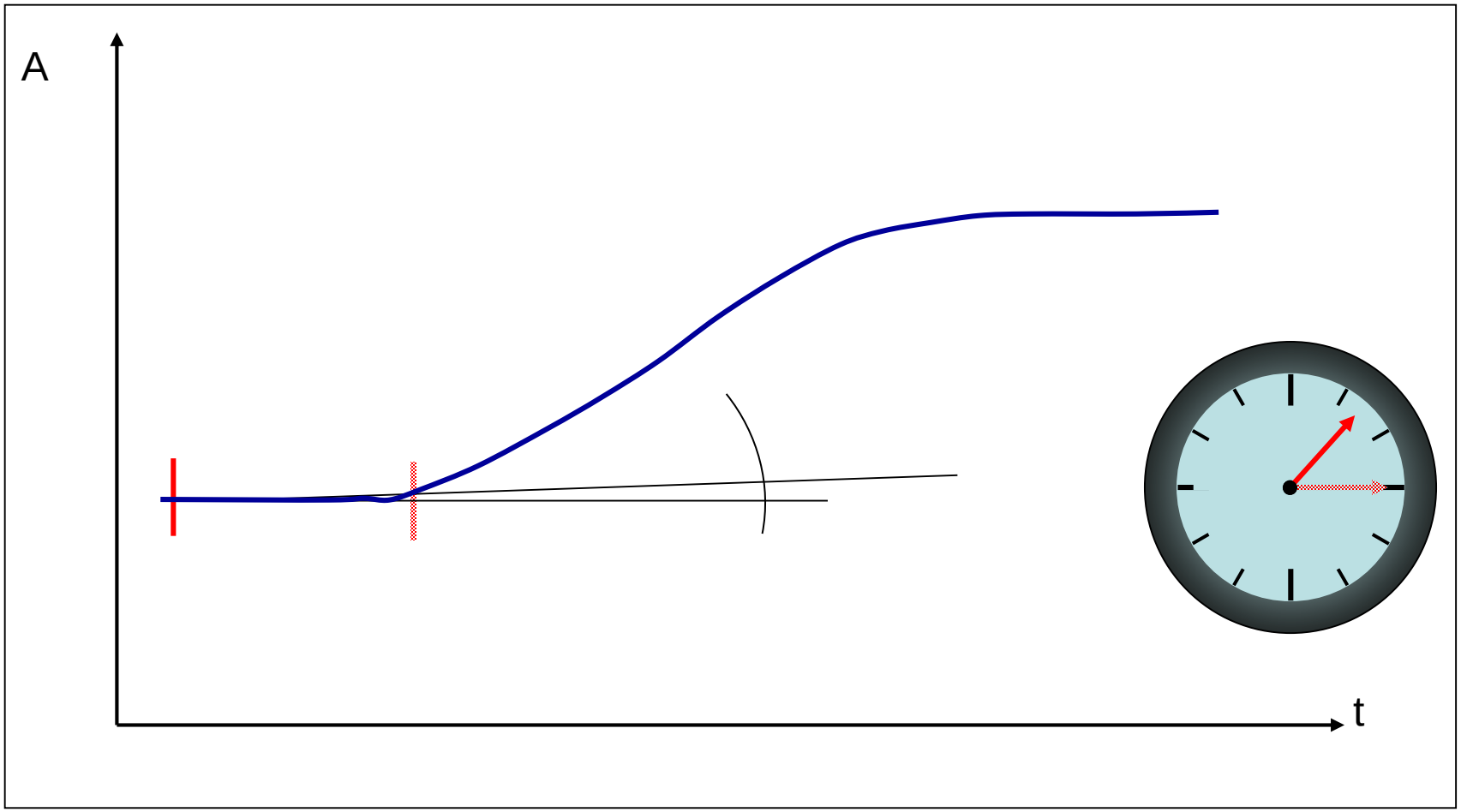
Počáteční rychlost



Počáteční rychlost



Počáteční rychlost



Počáteční rychlost

- Není problém u normálních vzorků
- Pomalu koagulující vzorky
  významné zkrácení času

Optické koagulometry

- Výhody
  - Jednodušší konstrukce
  - Snadná implementace do automatů
- Nevýhody
  - Nelze analyzovat zabarvené vzorky
  - Problémy při pomalém vzniku koagula
  - Nutno udržovat optiku v perfektní čistotě

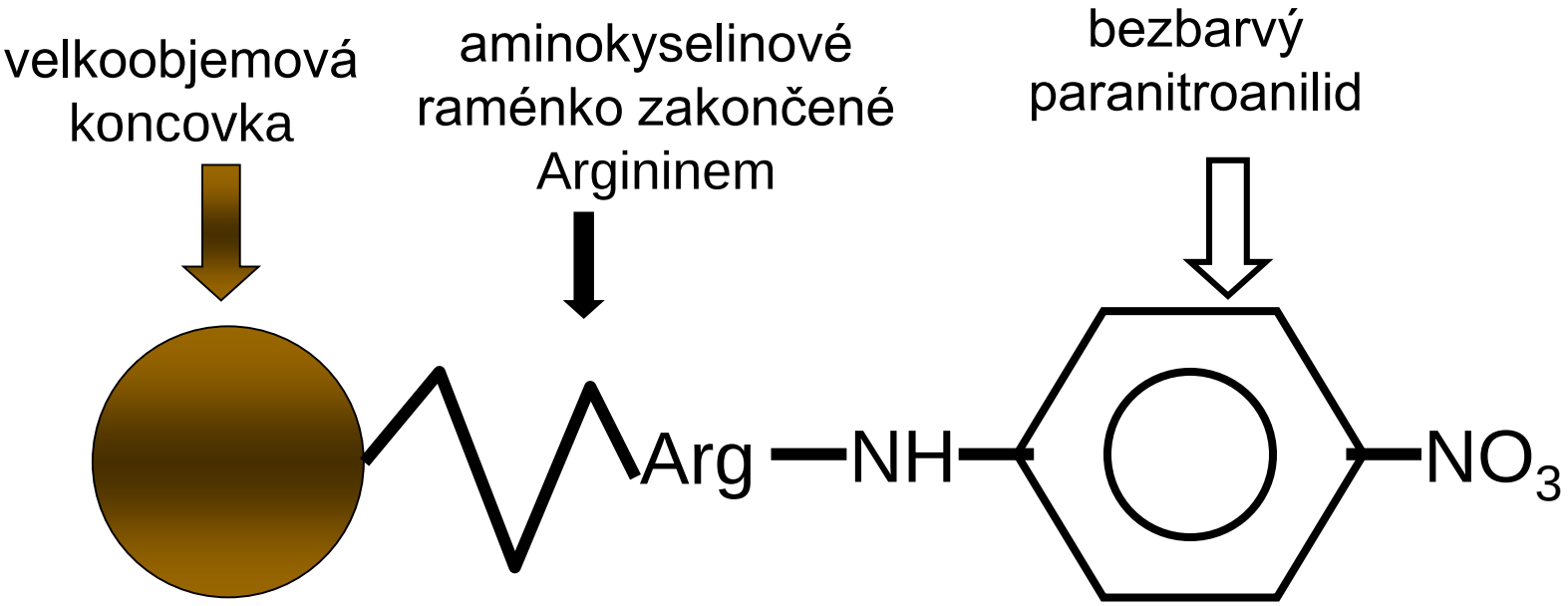
Dělení testů dle principu

- Fotometrické
  - **sledování změn zbarvení v důsledku štěpení specifického chromogenního substrátu** - detekce absorbance (A)
    - end point“ (A)
    - **kinetické (ΔA/min)**
  - limitace -hemolytické a ikterické vzorky

- Turbidimetrické (jiné než koagulační, imunochemické)
  - sledování změn zakalení
    - detekce změn transmise (propustnosti T)
    - detekce změn absorbance
  - limitace- chylózní vzorky

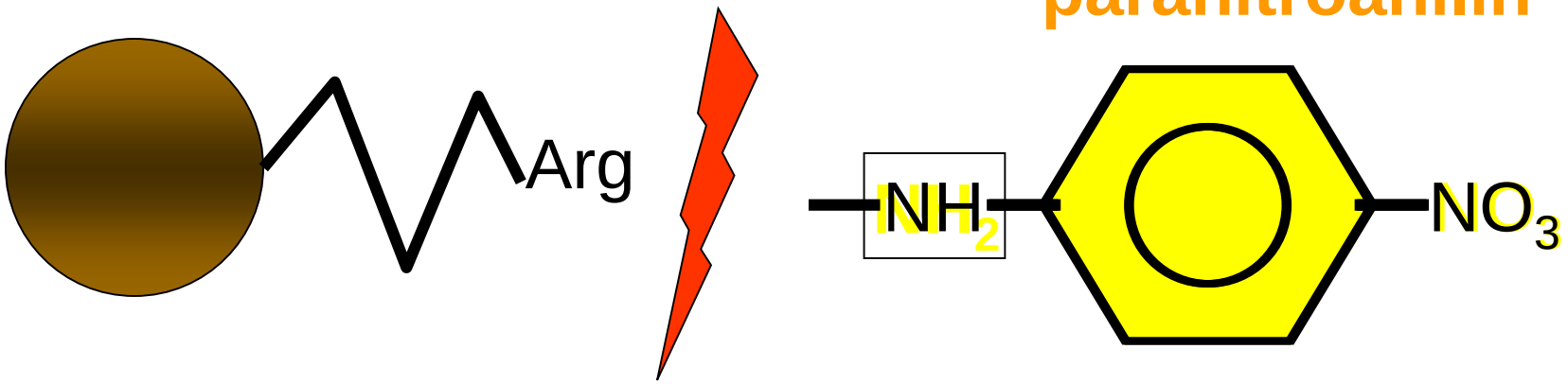
Chromogeny

- **Chromogenní substrát**
  - uměle připravený

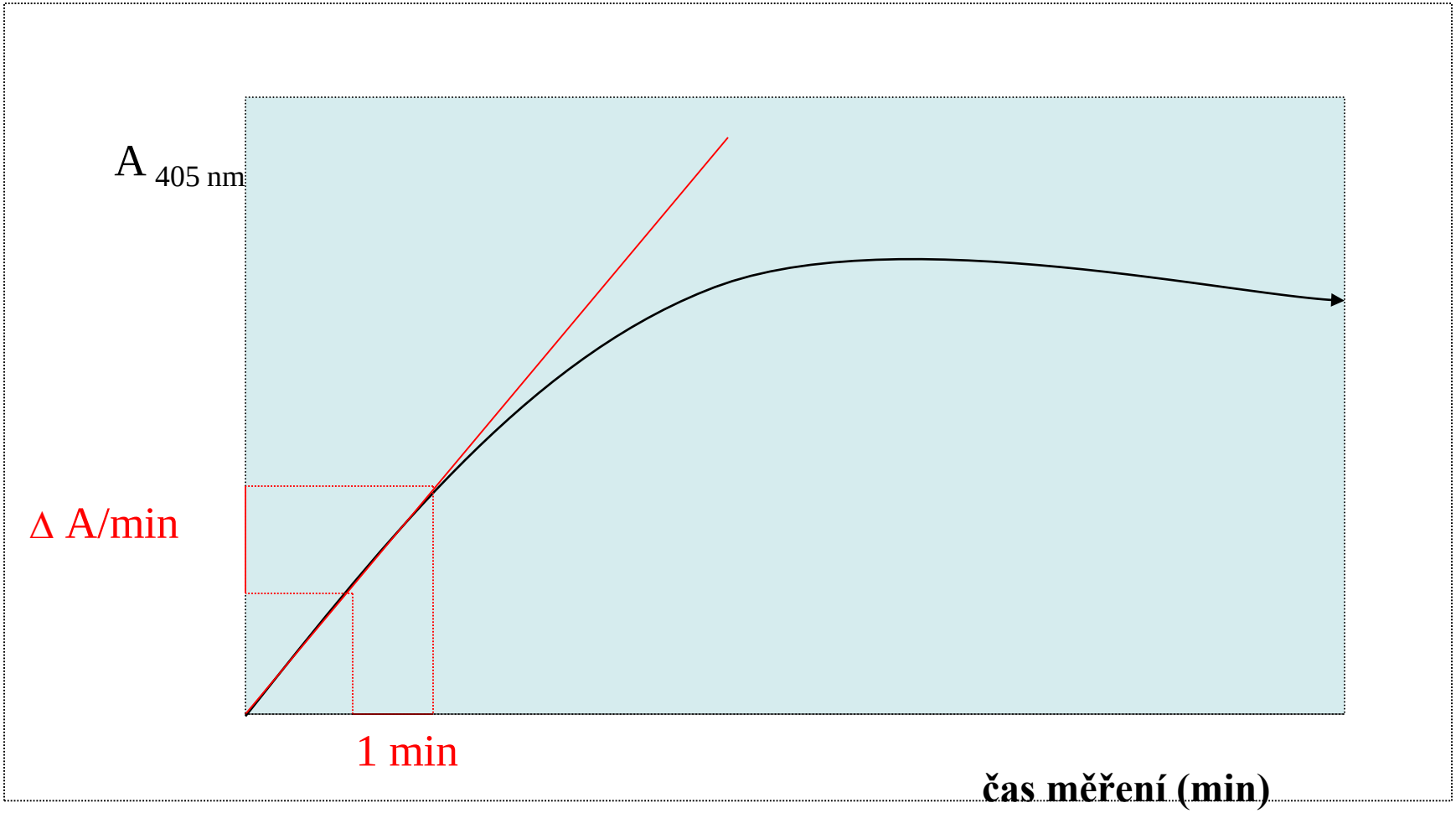


Chromogeny

- **Princip**
  - enzymy štěpí substrát – vzniká žluté zbarvení
  - měříme při 405 nm



Kinetické měření

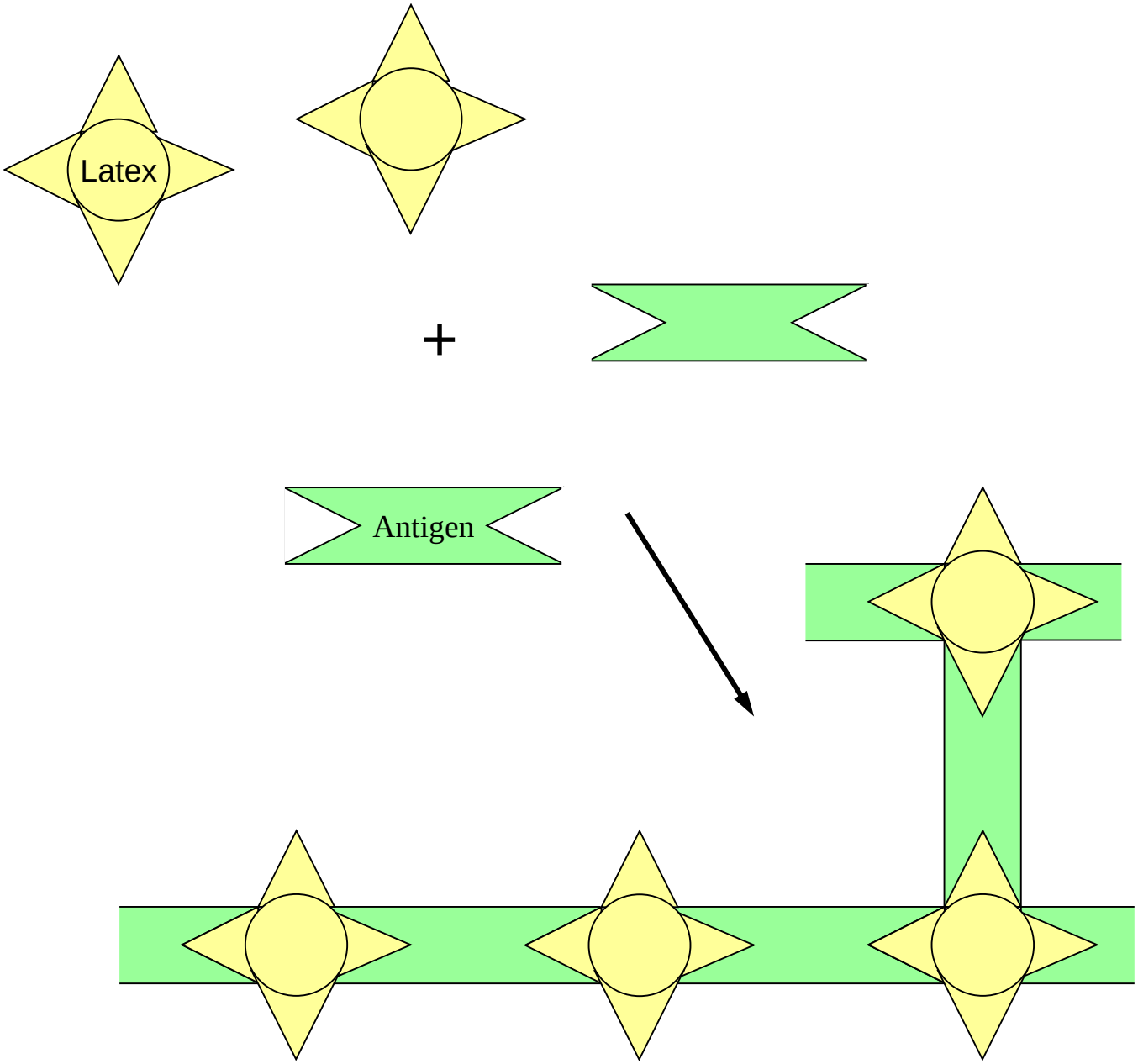


Dělení testů dle principu

- Imunochemické
  - **sledování reakce antigenu s protilátkou**
    - aglutinace
    - LIA
    - ELISA
    - EID

Aglutinační metody

- **sledování aglutinace viditelných částic s navázanou protilátkou proti vyšetřovanému antigenu**
- **odečítání makroskopicky**
  - pozitivní(+, ++, +++)/negativní
  - **semikvantitativní metody** (udaná mez detekce)
- metody
  - latexaglutinační (např. FDP, D-Di)
  - hemaglutinační (např. FM)


Latex
+
Antigen

Příklad vyšetření D-Dimerů – semikvantitativní výsledek

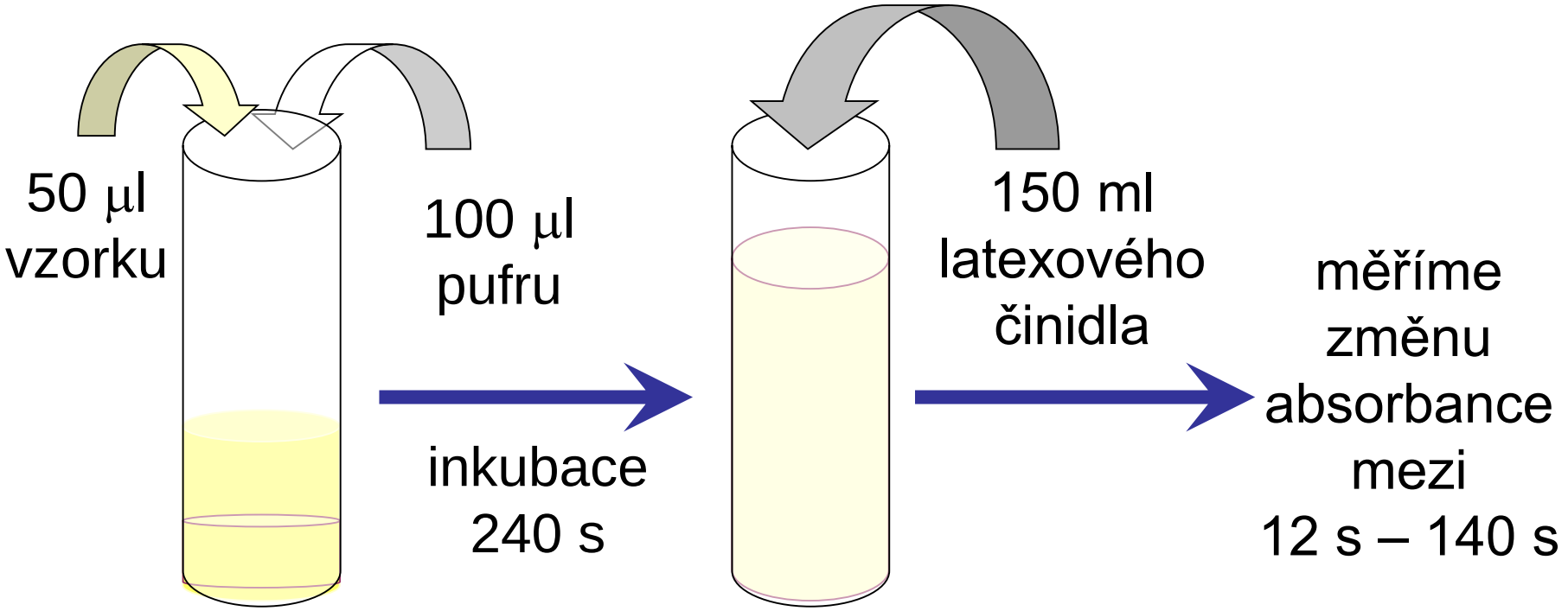
Mez detekce = 0,5 mg/l	Neředěný vzorek	Vzorek ředěný 1:6	Výsledek
aglutinace	-	-	< 0,5 mg/l
aglutinace	+	-	> 0,5 mg/l a < 3,0 mg/l
aglutinace	+	+	> 3,0 mg/l

Liquid immunoassay - LIA metody

- **sledování aglutinace mikrolatexových částic s navázanou protilátkou proti vyšetřovanému antigenu**
- **odečítání optickým systémem koagulometru**
  - Změna zakalení (ΔA/min)
- **kvantitativní metody** (např. D-Di, vWF:Ag…)
- Limitace
  - Chylozita vzorku
  - Hookův jev (vysycení protilátky antigenem)

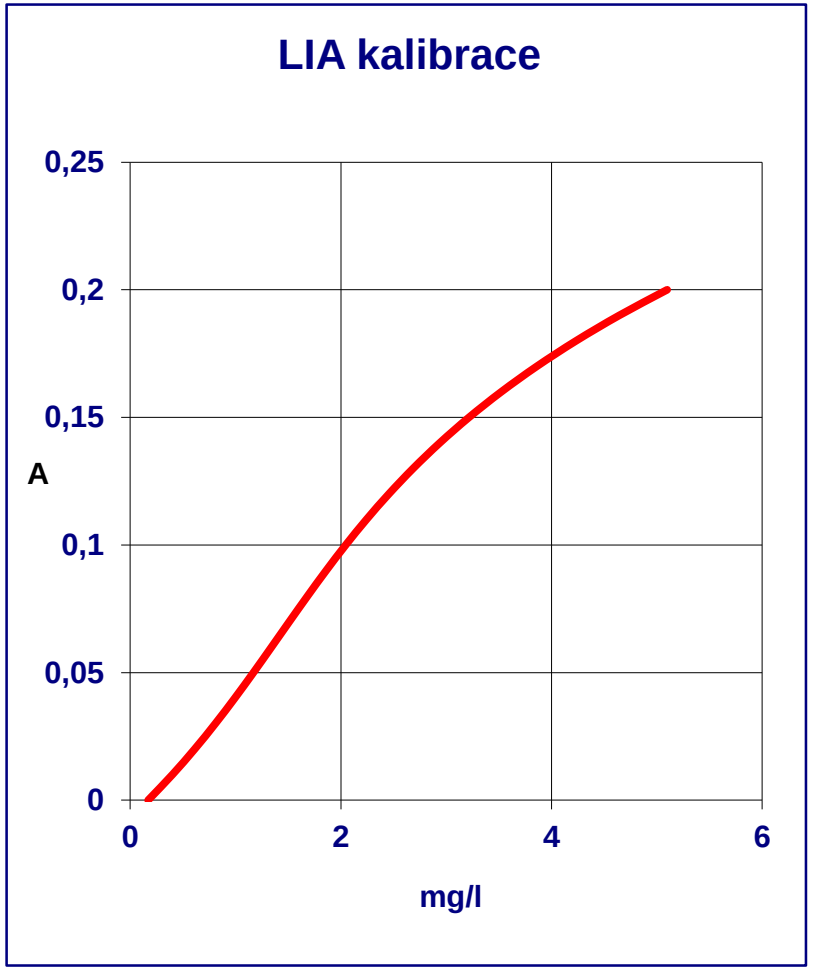
LIA testy

- **Provedení (**STA© Liatest© D-Dimer**)**



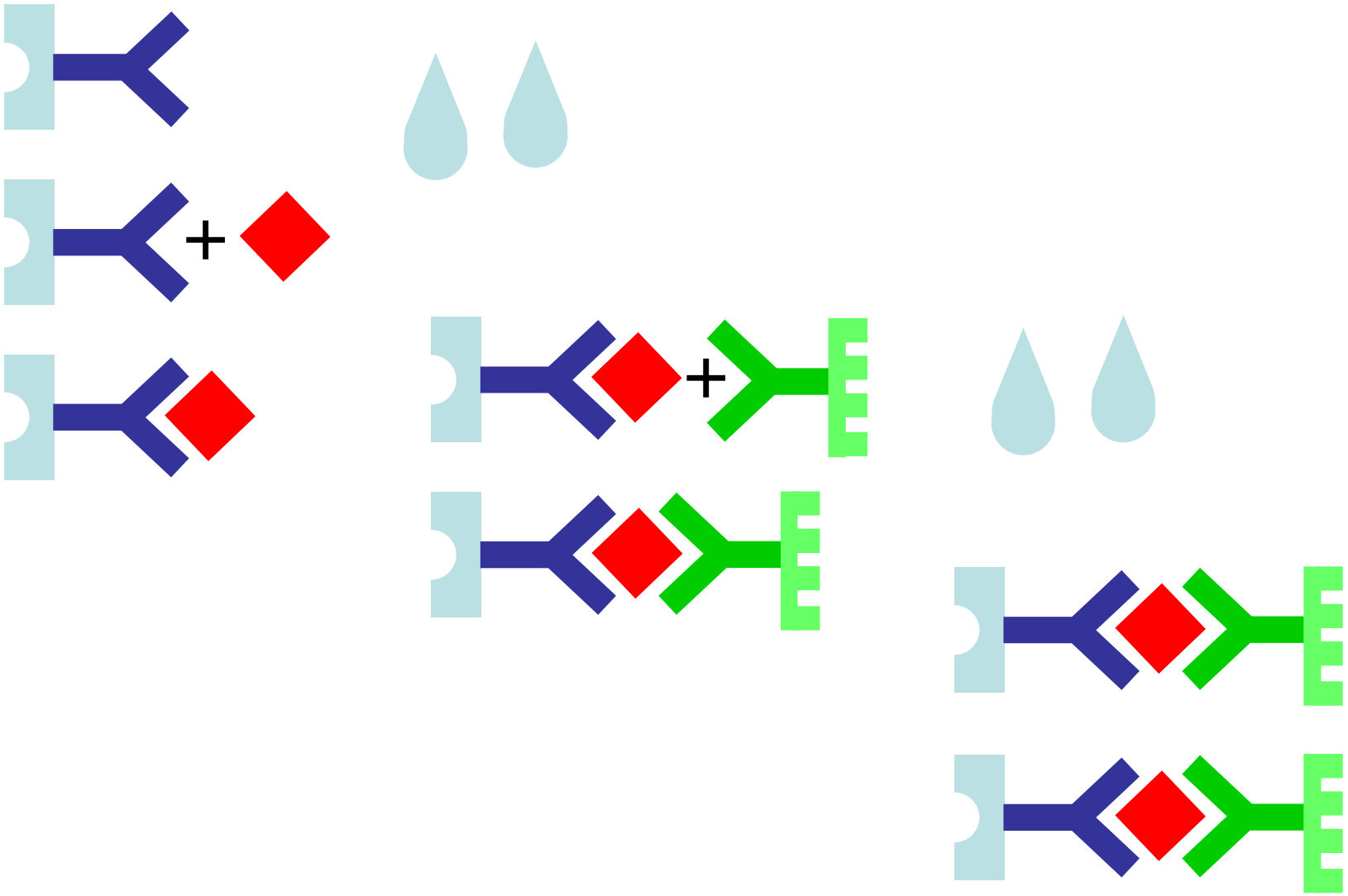
LIA testy

- **Kalibrace**
  - Sigmoidní
  - Křivka 3. řádu
  - Minimálně 5 bodů
  - Platí pro celou šarži



ELISA metody

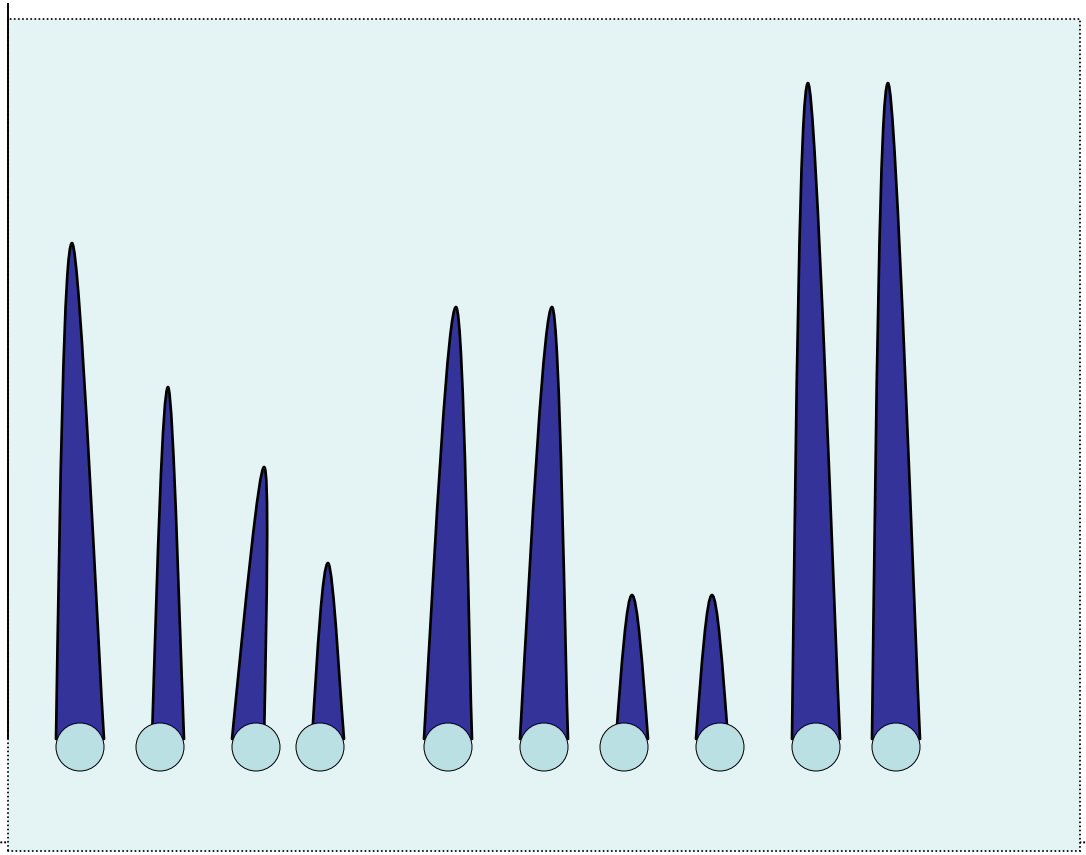
- **Stanovení antigenu(Ag)pomocí protilátky (Ab) značené enzymem (AbE) - kvantitativní**
  - inkubace vzorku v mikrotitračních jamkách s navázanou Ab proti vyš. Ag - vazba Ag na Ab
  - odsátí vzorku + promytí
  - inkubace AbE v jamkách - vazba na Ag
  - odsátí AbE a promytí
  - detekce enzymatické aktivity komplexu Ab-Ag -AbE po přídavku chromogenního substrátu (A)



Elektroimunodifúze - EID metody

- **vyšetřovaný antigen reaguje s protilátkou přítomnou v agarózovém gelu při elektroforéze za vzniku precipitačního píku**
- délka píku je přímo úměrná koncentraci antigenu
- kvantitativní metoda

Princip EID



kalibrace

vzorky pacientů

Vyšetření plazmatických proteinů

- Vyšetření funkční aktivity
  - koagulační metody
  - fotometrické metody
- Vyšetření antigenu
  - imunochemické metody
  - umožňují odlišení defektů
    - kvalitativních
    - kvantitativních